

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-080148

(43)Date of publication of application : 26.03.1999

---

(51)Int.CI.

C07D311/62

C08G 65/34

// C09K 15/34

---

(21)Application number : 09-251437

(71)Applicant : KIKKOMAN CORP

(22)Date of filing : 02.09.1997

(72)Inventor : TOKUTAKE SHOICHI

ARIGA TOSHIAKI

HOSOYAMA HIROSHI

---

## (54) PRODUCTION OF PROANTHOCYANIDIN

) (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the efficiency and purity in the extraction of proanthocyanidin from grape seeds, and their pomace.

SOLUTION: The proanthocyanidin is extracted from grape seeds or their pomace by heating and refluxing their mixture with water miscible solvent or a mixture of water soluble solvent and water. The extracting efficiency and purity of the proanthocyanidin are improved by a preliminary deaeration of the water miscible solvents or the mixture of water miscible solvent and water.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. \*\*\* shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

[Claim 1] The manufacturing method of the pro anthocyanidin characterized by extracting a grape seed or grape fruits juice lees with the mixed liquor of a water-soluble organic solvent or a water-soluble organic solvent, and water, carrying out heating reflux.

[Claim 2] The manufacturing method of the pro anthocyanidin according to claim 1 which uses it for an extract after deaerating beforehand the mixed liquor of a water-soluble organic solvent or a water-soluble organic solvent, and water.

[Claim 3] The manufacturing method of the pro anthocyanidin according to claim 1 a grape seed or whose grape fruits juice lees is the seed or juice lees of a grape of a white feather kind (RIKACHITERI kind), a MIRATORUGAU kind, or the Riesling kind.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the approach of manufacturing efficiently a pro anthocyanidin useful as manufacture raw materials, such as anti-oxidants, such as food and cosmetics, and a radical scavenger, drugs.

[0002]

[Description of the Prior Art] A pro anthocyanidin is condensation mold tannin which exists in [ various ] a plant body, it is the compound group combined by condensation or the polymerization by making flavan-3-oar or a flavan -3, and 4-diol into a configuration unit, and this name is conferred from the place where these generate anthocyanidins, such as cyanidin, delphinidin, and a pelargonidin, by acid treatment. And pro anthocyanidins, those stereoisomers, etc., such as pro cyanidin of the giant molecule of 10-30 or more \*\*\*'s, pro delphinidin, and a pro pelargonidin, are included in the dimer of the above-mentioned configuration unit, a trimer, and a tetramer pan.

[0003] Previously, this pro anthocyanidin found out having a strong antioxidation operation, and this invention person etc. did patent application as an anti-oxidant which uses a pro anthocyanidin as a principal component (JP,3-7232,B). Moreover, the pro anthocyanidin found out that it could extract from the juice lees of a grape seed or fruits efficiently above 70 degrees C bywater (JP,3-200781,A).

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] It is known well that this pro anthocyanidin will be obtained by extracting various plant bodies with organic solvents, such as water, and ethanol, an acetone, or these mixed liquor. And although extraction efficiency can be raised the more the more this extract operation has high extract temperature, there is a limitation below of the boiling point of a solvent also in extract temperature, and there is usually the present condition of having gained the fixed sampling volume, by lengthening extract time amount naturally.

[0005] However, the pro anthocyanidin extracted once decomposes the extract of long duration by the oxidation, and the pro anthocyanidin purity in an extract falls, and coloring also advances remarkably. Therefore, there is a fault that an impurity serves as remarkable \*\*\* rare \*\*\*\*\*, and this causes [ of commodity value ] a fall when disintegration is carried out, concentration and, as it is about an elevated-temperature extract.

[0006] This invention conquers the fault which the conventional manufacturing method has, and is made for the purpose of offering the approach of manufacturing the pro anthocyanidin of high purity, without reducing an extract rate and extraction efficiency.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In order that this invention persons may attain said purpose, as a result of repeating examination wholeheartedly, when extract operation was performed having heated the solvent and making it flow back, it found out that it can extract in a short time, and dissolved oxygen was removed, oxidization-decomposition was suppressed by the minimum, and the pro anthocyanidin of a high grade could be extracted.

[0008] Furthermore, since extract temperature was an elevated temperature inevitably, and in order that an extract might cause the convection current by reflux, it became clear that an extract rate and extraction efficiency are also very good. Based on these knowledge, it came to complete this invention.

[0009] This invention is explained to a detail below. Although any, such as a white grape, a red grape, and a black grape, are sufficient and it is not restricted at all about the form as a class of grape first used for this invention, the Chardonnay kind, the Riesling kind, a MIRATORUGAU kind, the Niagara kind, a neo-Muscat kind, the Koshu kind, a white feather kind (RIKACHITERI kind), the Kyoho kind, the Delaware kind, a SERESA kind, A sorts of Muscat Bury, etc. are mentioned, for example. Especially, since a white feather kind and a MIRATORUGAU kind have many pro anthocyanidin contents, they are suitable.

[0010] And they are the residue which squeezed fruits, such as a white grape described above, for example for a drink or wine manufacture, a red grape, and a black grape, as a raw material of an extract, and extracted fruit juice, i.e., the juice lees squeezed and obtained after the pre-fermentation in the case of juice lees or red wine manufacture, the seed further separated and obtained with the usual means, such as a rough screen, from these juice lees. Although usually contained about 5 to 20% (w/w) in juice lees, the pro anthocyanidin content of a seed is high, and since there are also few contents of impurity, such as a saccharide, it is a suitable raw material. In the case of a seed, since oil is contained in the interior, it is more desirable to perform extract processing as it is rather than crushing.

[0011] Although it is the water-soluble organic solvent used for this invention, if the target pro anthocyanidin can be extracted, what kind of solvent will be sufficient and water-soluble alcohols, such as a methanol, ethanol, isopropanol, and n-butanol, an acetone, ethyl methyl ketone, an acetonitrile, 1,4-dioxane, N,N-dimethylformamide (DMF), an acetic acid, etc. will specifically be mentioned as an example. Although you may use independently, water-soluble organic solvents are the purposes, such as adjustment of the boiling point, and adjustment of the balance of a pro anthocyanidin sampling volume and the amount of impurities, and by the ratio of arbitration, it may mix with water and they may be used.

[0012] In a water-soluble organic solvent, since toxicity's being low and the boiling point are comparatively low and the removal after an extract being easy and acquisition are easy, ethanol is especially desirable. When ethanol is used for an extracting solvent and it stands on the standpoint of it being high in extraction efficiency and lessening the rate of an impurity, the mixing ratios with 1:1-4:1 (v/v) are 2:1-3:1 (v/v). [desirable especially desirable / the mixing ratio of ethanol:water]

[0013] although especially the amount of the solvent to the raw material at the time of extracting (anhydride conversion) is not limited -- usually -- the amount (v/w) of one to 20 times -- it is the amount of two to 6 times preferably. Moreover, a small amount of surface active agents (for example, sucrose fatty acid ester etc.), anti-oxidants, etc. (for example, ascorbic acid etc.) may be added as occasion demands. Moreover, as occasion demands, you may extract under non-\*\* gas ambient atmospheres, such as nitrogen and an argon.

[0014] Since the time amount of the extract performed while making it flow back is remarkably influenced by extraction conditions, such as the amount of solvents, a class of solvent, and temperature, it chooses suitably so that the sampling volume and purity of a pro anthocyanidin in an extract may serve as max. Usually, it is 10 minutes - 24 hours, and is 30 minutes - about 2 hours preferably.

[0015] Although especially extent of reflux of an extracting solvent is not restricted, the strength of reflux is inevitably restricted by the class of solvent, an amount and the gestalt of a container, the capacity of a condensator, etc. However, it is desirable to make it flow back from the purpose of degassing (deoxidation) as violently as possible. In order that this may make coincidence amplify the convection current of an extract, it leads also to improvement in an extract rate or extractability. Moreover, in order to decrease the oxidative degradation of the pro anthocyanidin extracted by reflux initiation, as for a solvent and after contact, it is desirable for a raw material to be as quick as possible, to raise solution temperature, and to make reflux start. It is effective in decreasing the oxidative degradation of the pro anthocyanidin extracted by reflux initiation to perform degassing actuation of making it flow back in advance for about 1 hour etc. to the solvent used for an extract, and to perform

extract operation, after removing or decreasing dissolved oxygen.

[0016] Although the solution temperature of mixed liquor with a water-soluble organic solvent or its water must be raised till those boiling points in order to make an extracting solvent flow back, the pressure in an extract container may be reduced and you may make it flow back at low temperature more. That is, although there is no limit in the pressure in the container at the time of an extract, extracting by ordinary pressure is desirable in respect of the ease on actuation, or the ease of selection of the container in extensive processing (equipment).

[0017] A raw material can be contacted in water before an extract, since a water-soluble impurity is decreased, it can extract, and the purity of the pro anthocyanidin in an extract can also be raised. In this case, as for contact in water, it is desirable to carry out at about 30-60-degree C low temperature in order to prevent reduction of the pro anthocyanidin which should be extracted essentially.

[0018] Moreover, if yeast is added and fermented in a pro anthocyanidin extract after an extract, utilization of the sugar contained as an impurity in an extract can be carried out, and it can serve as alcohol, therefore pro anthocyanidin purity can also be raised relatively. The yeast belonging to *Saccharomyces*, a CHIGOSAKKAROMAISESU group, etc. can be used for the yeast to add, for example, commercial wine yeast, sake yeast, baker's yeast, etc. can be used for it. What is necessary is to adjust the temperature of a pro anthocyanidin extract to 5-35 degrees C, to adjust pH to 3-7, and just to add yeast that what is necessary is just to make yeast act as conditions made to add and act by the operation optimum temperature of the yeast to be used, and pH. The time amount made to act is 24 hours or more preferably for 12 hours or more. Moreover, the additions of yeast are 104-108 pieces / about 1ml of extracts.

[0019] Extent content of the pro anthocyanidin is usually carried out 0.1 to 5.0% (w/v) at the pro anthocyanidin content solution obtained as mentioned above. If reduced pressure distilling off etc. removes an extracting solvent from this thing, it can obtain as a pro anthocyanidin content concentrate or a dry matter as it is. Although the pro anthocyanidin dry matter which has 90% or more of high purity can also be easily obtained if the optimal raw material and the optimal extraction condition are used as shown in an example Further a concentrate and a dry matter Sephadex, a polyamide, silica gel, A high grade or the pro anthocyanidin product of a degree of polymerization to desire can be obtained more by performing purification and separation / decolorization actuation. [, such as liquid-liquid separation using membrane separation, ethyl-acetate-water, etc. using a column chromatograph, a cellulose wall, etc. using ODS etc., ]

[0020]

[Effect of the Invention] According to this invention, it is efficient at easy actuation and, moreover, a pro anthocyanidin useful as manufacture raw materials, such as anti-oxidants, such as food and cosmetics, and a radical scavenger, drugs, can be obtained by the high grade.

[0021]

[Example] Although an example is shown below and this invention is explained to it still more concretely, this invention is not limited to these examples. In addition, the quantum of the pro anthocyanidin in an example was performed by following R.Jambunathan's and others approach (J.Agric.Food Chem., 34, and {425-429} (1986)). That is, the pro anthocyanidin content sample was heat-treated under dilute-hydrochloric-acid existence, reddening of the pro anthocyanidin was carried out, and the quantum of the pro anthocyanidin was carried out from the calibration curve which carried out separation purification and created the pro cyanidin tetramer as a reference standard from the alcohol which does not shine using the measured value of the absorbance in this wavelength of 550nm, and the approach (J.Sci.Food Agric., 26, and {471-477} (1978)) of A.G.H.Lea. Moreover, after freeze-drying and carrying out weighing capacity of all the volume of a pro anthocyanidin content extract or measuring all volume correctly, the extract (usually 5 mL(s)) of a constant rate is measured, and after carrying out heating hardening by drying (usually 88 degrees C -1.5 hr and 110 degrees C -2.0 hr), and leaving this in 1hr room temperature in the desiccator, weighing capacity was carried out, and the solid content weight of an extract computed it by having carried out all volume conversions.

[0022] After extracting 2hr(s) and carrying out solid liquid separation of the 20g of the seeds of example

1 grape (white feather kind from China) in various temperature (outside temperature) in mixed liquor 80mL of ethanol-water (3:1, v/v), it added water and the founding liquid of 100mL(s) was obtained. The solid daily dose pile (the heat drying method) of this founding liquid, the amount of pro anthocyanidins, and purity (the amount of pro anthocyanidins / solid daily dose pile) are shown in Table 1.

[0023]

[Table 1]

抽出温度 (°C)	固形分量重	プロアントシアニジン量	純度
60 (従来法：時々攪拌)	1.07g	0.91g	85%
80 (従来法：時々攪拌)	1.52g	1.28g	84%
90 (本発明：還流)	1.84g	1.61g	88%

[0024] When it extracts flowing back from the above result, it turns out that a sampling volume increases remarkably and purity will also become high.

[0025] Making 20g of seeds of an example 2\*\* grape (white feather kind from China) flow back in 95 degrees C (outside temperature) in mixed liquor 80mL of ethanol-water (3:1, v/v), 2hr(s) were extracted, after carrying out solid liquid separation, it added water and the founding liquid of 100mL(s) was obtained.

\*\* Water 80mL was added to 20g of seeds of a grape (white feather kind from China), carrying out back (rinsing processing) solid liquid separation, and making a seed flow back in 95 degrees C (outside temperature) in mixed liquor 80mL of ethanol-water (3:1, v/v), 2hr(s) were extracted, after [ which carried out 2hr gentle placement at 45 degrees C ] carrying out solid liquid separation, it added water and the founding liquid of 100mL(s) was obtained.

\*\* In mixed liquor 80mL of the ethanol (reflux 2hr)-water (3:1, v/v) which added water 80mL to 20g of seeds of a grape (white feather kind from China), and carried out 2hr gentle placement at 45 degrees C and which carried out back (rinsing processing) solid liquid separation, and deaerated the seed beforehand Making it flow back in 95 degrees C (outside temperature), 2hr(s) were extracted, after carrying out solid liquid separation, it added water and the founding liquid of 100mL(s) was obtained.

[0026] The solid daily dose pile (the heat drying method) of these founding liquid, the amount of pro anthocyanidins, and purity (the amount of pro anthocyanidins / solid daily dose pile) are shown in Table 2.

[0027]

[Table 2]

	水洗処理	事前脱気	固形分量重	プロアントシアニジン量	純度
①	なし	なし	1.84g	1.61g	88%
②	あり	なし	1.65g	1.53g	93%
③	あり	あり	1.57g	1.50g	96%

[0028] In case it extracts heating and flowing back from the above result, by carrying out rinsing processing of the seed, and deaerating an extracting solvent in advance shows raising the pro anthocyanidin purity in an extract.

[0029] Water 80mL was added to 20g of seeds of example 3 grape (white feather kind from China), after [ which carried out 2hr gentle placement at 45 degrees C ] having carried out back (rinsing processing) solid liquid separation, extracting 2hr(s) and carrying out solid liquid separation of the seed, having heated and making 90 degrees C (outside temperature) set and flow back in mixed liquor 80mL of ethanol-water (3:2, v/v), it added water and the founding liquid of 100mL(s) was obtained.

[0030] Instead of the seed of a grape (white feather kind from China), the same actuation as an example 3 was performed in example 4 raw material except using 20g of seeds of a grape (SERESA kind from Argentina), and the founding liquid of 100mL(s) was obtained in it.

[0031] Water 80mL was added to 20g of seeds of the example grape of a comparison (SERESA kind from Argentina), having carried out back (rinsing processing) solid liquid separation, and sometimes

agitating a seed in 40 degrees C (outside temperature) in mixed liquor 80mL of ethanol-water (1:4, v/v), 48hr(s) were extracted, after [ which carried out 2hr gentle placement at 45 degrees C ] carrying out solid liquid separation, it added water and the founding liquid of 100mL(s) was obtained.

[0032] The solid daily dose pile (the heat drying method) of the founding liquid of these examples 3 and 4 and the example of a comparison, the amount of pro anthocyanidins, and purity (the amount of pro anthocyanidins / solid daily dose pile) are shown in Table 3.

[0033]

[Table 3]

	固形分量重	プロアントシアニジン量	純度
実施例3	1.82g	1.70g	93%
実施例4	1.79g	1.14g	64%
比較例	1.45g	0.70g	48%

[0034] If it extracts flowing back with the water containing high-concentration ethanol so that clearly from the result shown in Table 3, the pro anthocyanidin purity and \*\*\*\*\* in an extract can be improved remarkably, and the white feather kind is superior to the SERESA kind as a seed of the grape which is a raw material.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-80148

(43) 公開日 平成11年(1999)3月26日

(51) IntCl<sup>6</sup>  
C 07 D 311/62  
C 08 G 65/34  
// C 09 K 15/34

識別記号

F I  
C 07 D 311/62  
C 08 G 65/34  
C 09 K 15/34

審査請求 未請求 請求項の数3 FD (全5頁)

(21) 出願番号 特願平9-251437

(22) 出願日 平成9年(1997)9月2日

(71) 出願人 000004477  
キッコーマン株式会社  
千葉県野田市野田339番地  
(72) 発明者 徳武 昌一  
千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内  
(72) 発明者 有賀 敏明  
千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内  
(72) 発明者 細山 浩  
千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内

(54) 【発明の名称】 プロアントシアニジンの製造法

(57) 【要約】

【課題】ブドウ種子、搾汁粕からのプロアントシアニジンの抽出において、プロアントシアニジンの抽出効率、純度の向上を計ること。

【解決手段】ブドウ種子又はブドウ果実搾汁粕を水溶性有機溶媒又は水溶性有機溶媒と水との混合液で、加熱還流させながら抽出する。また水溶性有機溶媒又は水溶性有機溶媒と水との混合液を、予め脱気したのち抽出に用いることにより高純度のプロアントシアニジンを効率よく製造することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ブドウ種子又はブドウ果実搾汁粕を水溶性有機溶媒又は水溶性有機溶媒と水との混合液で、加熱還流させながら抽出することを特徴とするプロアントシアニジンの製造法。

【請求項2】水溶性有機溶媒又は水溶性有機溶媒と水との混合液を、予め脱気したのち抽出に用いる請求項1記載のプロアントシアニジンの製造法。

【請求項3】ブドウ種子又はブドウ果実搾汁粕が白羽種(リカチテリ種)、ミラトルガウ種又はリースリング種のブドウの種子又は搾汁粕である請求項1記載のプロアントシアニジンの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は食品、化粧品等の酸化防止剤やラジカル捕捉剤、医薬品等の製造原料として有用なプロアントシアニジンを効率よく製造する方法に係るものである。

## 【0002】

【従来の技術】プロアントシアニジンは、各種植物体中に存在する縮合型タンニンで、フラパン-3-オールまたはフラパン-3, 4-ジオールを構成単位として縮合もしくは重合により結合した化合物群であり、これらは酸処理によりシアニジン、デルフィニジン、ペラルゴニジン等のアントシアニジンを生成するところから、この名称が与えられているものである。そして上記構成単位の2量体、3量体、4量体さらに10~30量体以上の高分子のプロシアニジン、プロデルフィニジン、プロペラルゴニジン等のプロアントシアニジンおよびそれらの立体異性体等を含むものである。

【0003】本発明者等は先にこのプロアントシアニジンが強い抗酸化作用を有することを見い出し、プロアントシアニジンを主成分とする抗酸化剤として特許出願した(特公平3-7232号)。またプロアントシアニジンが、ブドウ種子又は果実の搾汁粕から水により70°C以上で効率よく抽出できることを見い出した(特開平3-200781号)。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】このプロアントシアニジンが、各種植物体を水やエタノール、アセトン等の有機溶媒、又はこれらの混合液で抽出することにより得られることはよく知られている。そして通常この抽出操作は、抽出温度が高ければ高いほど抽出効率を向上させることができるが、抽出温度にも溶媒の沸点以下という限界があり、自ずと抽出時間を長くすることにより、一定の抽出量を獲得している現状がある。

【0005】しかしながら長時間の抽出は、一度抽出されたプロアントシアニジンが、酸化作用により分解し、抽出液中のプロアントシアニジン純度が低下し、また著しく着色も進行する。したがって高温抽出液をそのまま

濃縮、粉末化した場合、不純物がかなりの量含まれることとなり、これが商品価値の低下の原因となるという欠点がある。

【0006】本発明は従来の製造法が有する欠点を克服し、抽出速度や抽出効率を低下させずに、高い純度のプロアントシアニジンを製造する方法を提供すること目的としてなされたものである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記目的を達成するために、鋭意検討を重ねた結果、溶媒を加熱、還流させながら抽出操作を行うと、短時間で抽出が可能であり、また溶存酸素が除去され、酸化的分解が最少に抑えられて、高純度のプロアントシアニジンが抽出できることを見い出した。

【0008】さらに抽出温度は必然的に高温であるため、また還流によって抽出液が対流を起こすため、抽出速度や抽出効率は極めて良好であることも判明した。これらの知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

【0009】以下本発明を詳細に説明する。まず本発明に用いられるブドウの種類としては、白ブドウ、赤ブドウ、黒ブドウ等のいずれでもよく、その品種については何等制限されないが、例えばシャルドネ種、リースリング種、ミラトルガウ種、ナイアガラ種、ネオ・マスカット種、甲州種、白羽種(リカチテリ種)、巨峰種、デラウェア種、セレサ種、マスカットベリーA種等が挙げられる。中でも白羽種やミラトルガウ種はプロアントシアニジン含有量が多いので好適である。

【0010】そして抽出の原料としては、例えば飲料やワイン製造のために上記した白ブドウ、赤ブドウ、黒ブドウ等の果実を圧搾して果汁を採取した残渣、すなわち搾汁粕や赤ぶどう酒製造の際の前発酵後に圧搾して得られる搾汁粕、さらには該搾汁粕より粗篩等の通常の手段で分離して得られる種子等である。種子は通常搾汁粕中に約5~20% (w/w) 含まれるが、プロアントシアニジン含量が高く、糖類などの夾雑物の含量も少ないため、好適な原料である。種子の場合は、その内部に油分を含有しているので、破碎するよりもそのまま抽出処理を行うことが好ましい。

【0011】本発明に用いられる水溶性有機溶媒であるが、目的のプロアントシアニジンを抽出することができれば、どのような溶媒でもよく、具体的にはメタノール、エタノール、イソプロパノール、n-ブタノール等の水溶性アルコール類、アセトン、エチルメチルケトン、アセトニトリル、1, 4-ジオキサン、N, N-ジメチルホルムアミド(DMF)、酢酸等が例として挙げられる。水溶性有機溶媒は単独で用いてもよいが、沸点の調整、プロアントシアニジン抽出量と不純物量のバランスの調整等の目的で、任意の比で水と混合して用いてもよい。

【0012】特に水溶性有機溶媒の中では、毒性が低い

こと、沸点が比較的低いため抽出後の除去が容易であること、入手が容易であることなどからエタノールが好ましい。エタノールを抽出溶媒に用いた場合、抽出効率を高く、不純物の割合を少なくするという見地に立つと、エタノール：水の混合比は1：1～4：1(v/v)が好ましく、特に好ましい混合比は2：1～3：1(v/v)である。

【0013】抽出する際の原料(無水物換算)に対する溶媒の量は特に限定しないが、通常1～20倍量(v/w)、好ましくは2～6倍量である。また必要により少量の界面活性剤(例えばショ糖脂肪酸エステル等)や酸化防止剤(例えばアスコルビン酸等)などを加えてよい。また必要により、窒素やアルゴンなどの不活ガス雰囲気下で抽出を行ってもよい。

【0014】還流させながら行う抽出の時間は、溶媒量、溶媒の種類、温度等の抽出条件に著しく左右されるため、抽出物中のプロアントシアニジンの抽出量と純度が最大となるよう適宜選択をする。通常は10分～24時間であり、好ましくは30分～2時間程度である。

【0015】抽出溶媒の還流の程度は特に制限されないが、溶媒の種類や量、容器の形態、冷却器の能力などにより必然的に還流の強さは制限される。しかし脱気(脱酸素)という目的から、可能な限り激しく還流させることが望ましい。同時にこのことは抽出液の対流を增幅させるため、抽出速度や抽出率の向上にもつながる。また還流開始までに抽出されるプロアントシアニジンの酸化的分解を減少させるため、原料が溶媒と接触後は、出来得る限り素早く液温を上昇させ、還流を開始させることが望ましい。抽出に用いる溶媒に対して、事前に1時間程度還流させるなどの脱気操作を行い、溶存酸素を除去又は減少させた後に抽出操作を行うことは、還流開始までに抽出されるプロアントシアニジンの酸化的分解を減少させる効果がある。

【0016】抽出溶媒を還流させるためには、水溶性有機溶媒又はその水との混合液の液温を、それらの沸点まで上昇させなくてはならないが、抽出容器内の圧力を低下させてより低温で還流させてもよい。すなわち抽出時の容器内の圧力には制限がないのであるが、操作上の容易さや大量処理の場合の容器(装置)の選定の容易さの点で、常圧で抽出することが望ましい。

【0017】抽出前に原料を水と接触させ、水溶性の不純物を減少させてから抽出を行い、抽出物中のプロアントシアニジンの純度を向上させることもできる。この場合水との接触は、本来抽出されるべきプロアントシアニジンの減少を防ぐため、30～60°C程度の低温で行うことが好ましい。

【0018】また抽出後に、プロアントシアニジン抽出物に酵母を添加し、発酵させれば、抽出物中に不純物として含有される糖分が資化されてアルコールとなり、従って相対的にプロアントシアニジン純度を向上させるこ

ともできる。添加する酵母は、サッカロマイセス属、チゴサッカロマイセス属等に属する酵母を使用することができ、例えば市販のワイン酵母、清酒酵母、パン酵母等が使用できる。酵母を添加、作用させる条件としては、使用する酵母の作用至適温度、pHで作用させなければよく、例えばプロアントシアニジン抽出物の温度を5～35°C、pHを3～7に調整し、酵母を添加すればよい。作用させる時間は12時間以上、好ましくは24時間以上である。また酵母の添加量は10<sup>4</sup>～10<sup>5</sup>個/抽出物1mL程度である。

【0019】以上のようにして得られたプロアントシアニジン含有溶液にはプロアントシアニジンが、通常0.1～5.0%(w/v)程度含有されている。このものから抽出溶媒を減圧留去などによって除去すれば、そのままプロアントシアニジン含有濃縮物や乾燥物として得ることができる。実施例に示すように、最適の原料と抽出条件を用いれば、90%以上の高い純度を有するプロアントシアニジン乾燥物を、簡単に得ることもできるが、濃縮物や乾燥物を更に、セファデックス、ポリアミド、シリカゲル、ODS等を用いたカラムクロマトグラフ、セルロース膜等を用いた膜分離、酢酸エチル-水等を用いた液液分離など精製・分離・脱色操作を行うことにより、より高純度の、あるいは望む重合度のプロアントシアニジン製品を得ることができる。

#### 【0020】

【発明の効果】本発明によれば、食品、化粧品等の酸化防止剤やラジカル捕捉剤、医薬品等の製造原料として有用なプロアントシアニジンを簡単な操作で効率よく、しかも高純度で得ることができる。

#### 【0021】

【実施例】以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。なお実施例におけるプロアントシアニジンの定量は、下記のR. Jambunathanらの方法{J. Agric. Food Chem., 34, 425～429 (1986)}により行った。すなわちプロアントシアニジン含有試料を希塩酸存在下で加熱処理してプロアントシアニジンを赤色化し、この波長550nmにおける吸光度の測定値と、A.G.H. Leaの方法{J. Sci. Food Agric., 26, 471～477 (1978)}を用いてりんご酒より分離精製してプロシアニジン4量体を標準品として作成した検量線とからプロアントシアニジンを定量した。また抽出液の固形分重量は、プロアントシアニジン含有抽出液の全液量を凍結乾燥して秤量するか、全液量を正確に測定した後、一定量の抽出液(通常5mL)を量りとり、これを加熱乾固(通常88°C-1.5hr及び110°C-2.0hr)した後、デシケーター中で1hr室温に放置してから秤量し、全液量換算して算出した。

#### 【0022】実施例1

ブドウ(中国産白羽種)の種子20gをエタノール-水

(3 : 1, v/v) の混合液 80 mL 中で、各種温度(外温)において 2 h r の抽出を行い、固液分離したのち、加水して 100 mL の清澄液を得た。この清澄液の固体分量重(熱乾燥法)、プロアントシアニジン量、純度\*

\* 度(プロアントシアニジン量/固体分量重)を表1に示す。

## 【0023】

【表1】

抽出温度(°C)	固体分量重	プロアントシアニジン量	純度
60(従来法: 時々攪拌)	1.07g	0.91g	85%
80(従来法: 時々攪拌)	1.52g	1.28g	84%
90(本発明: 還流)	1.84g	1.61g	88%

【0024】以上の結果から還流しながら抽出を行った場合、抽出量が著しく増大し、また純度も高いものとなることが判る。

## 【0025】実施例2

①ぶどう(中国産白羽種)の種子 20 g をエタノールー水(3 : 1, v/v) の混合液 80 mL 中で、95 °C(外温)において還流させながら 2 h r の抽出を行い、固液分離したのち、加水して 100 mL の清澄液を得た。

②ぶどう(中国産白羽種)の種子 20 g に水 80 mL を加え、45 °C で 2 h r 静置した(水洗処理)後固液分離し、種子をエタノールー水(3 : 1, v/v) の混合液 80 mL 中で、95 °C(外温)において還流させながら 2 h r の抽出を行い、固液分離したのち、加水して 100 mL の清澄液を得た。

20 【0026】これらの清澄液の固体分量重(熱乾燥法)、プロアントシアニジン量、純度(プロアントシアニジン量/固体分量重)を表2に示す。

10※ 0 mL の清澄液を得た。

③ぶどう(中国産白羽種)の種子 20 g に水 80 mL を加え、45 °C で 2 h r 静置した(水洗処理)後固液分離し、種子をあらかじめ脱気しておいた(還流 2 h r) エタノールー水(3 : 1, v/v) の混合液 80 mL 中で、95 °C(外温)において還流させながら 2 h r の抽出を行い、固液分離したのち、加水して 100 mL の清澄液を得た。

【0027】これら実施例2の清澄液の固体分量重(熱乾燥法)、プロアントシアニジン量、純度(プロアントシアニジン量/固体分量重)を表2に示す。

## 【0027】

【表2】

	水洗処理	事前脱気	固体分量重	プロアントシアニジン量	純度
①	なし	なし	1.84g	1.61g	88%
②	あり	なし	1.65g	1.53g	93%
③	あり	あり	1.57g	1.50g	96%

【0028】以上の結果から加熱、還流しながら抽出を行な際に、種子を水洗処理し、また抽出溶媒を事前に脱気する事により、抽出物中のプロアントシアニジン純度を向上させることが判る。

## 【0029】実施例3

ぶどう(中国産白羽種)の種子 20 g に水 80 mL を加え、45 °C で 2 h r 静置した(水洗処理)後固液分離し、種子をエタノールー水(3 : 2, v/v) の混合液 80 mL 中で、90 °C(外温)において加熱、還流させながら 2 h r の抽出を行い、固液分離したのち、加水して 100 mL の清澄液を得た。

## 【0030】実施例4

原料にぶどう(中国産白羽種)の種子の代わりに、ぶどう(アルゼンチン産セレサ種)の種子 20 g を用いること以外実施例3と同様の操作を行って 100 mL の清澄★

★液を得た。

## 30 【0031】比較例

ぶどう(アルゼンチン産セレサ種)の種子 20 g に水 80 mL を加え、45 °C で 2 h r 静置した(水洗処理)後固液分離し、種子をエタノールー水(1 : 4, v/v) の混合液 80 mL 中で、40 °C(外温)においてときどき攪拌しながら 48 h r の抽出を行い、固液分離したのち、加水して 100 mL の清澄液を得た。

【0032】これら実施例3、4及び比較例の清澄液の固体分量重(熱乾燥法)、プロアントシアニジン量、純度(プロアントシアニジン量/固体分量重)を表3に示す。

## 【0033】

【表3】

	固体分量重	プロアントシアニジン量	純度
実施例3	1.82g	1.70g	93%
実施例4	1.79g	1.14g	64%
比較例	1.45g	0.70g	48%

【0034】表3に示した結果から明らかなように、高濃度のエタノールを含む水で還流しながら抽出を行う

(5)

特開平11-80148

7

と、抽出物中のプロアントシアニジン純度及び収量をを  
著しく向上でき、また原料であるぶどうの種子として

8

は、セレサ種よりも白羽種が優れている。